

# PRODUCTION OF PARTICLE OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS @ (3754/24)IBDV) HAVING PROTECTIVE ANTIGENICITY

Publication number: JP5194597

Publication date: 1993-08-03

Inventor: KATO ATSUSHI

Applicant: NIPPON SEIBUTSU KAGAKU KENKYUS

Classification:

- International: A61K39/12; A61P31/12; C07K14/005; C07K14/195; C12N7/00; C12N15/09; C12N15/41; C12P21/02; G01N33/569; C12R1/91; A61K39/12; A61P31/00; C07K14/005; C07K14/195; C12N7/00; C12N15/09; C12N15/40; C12P21/02; G01N33/569; C12P21/02; (IPC1-7): A61K39/12; C07K15/04; C12N7/00; C12N15/41; C12P21/02; G01N33/569

- European:

Application number: JP19910339013 19911220

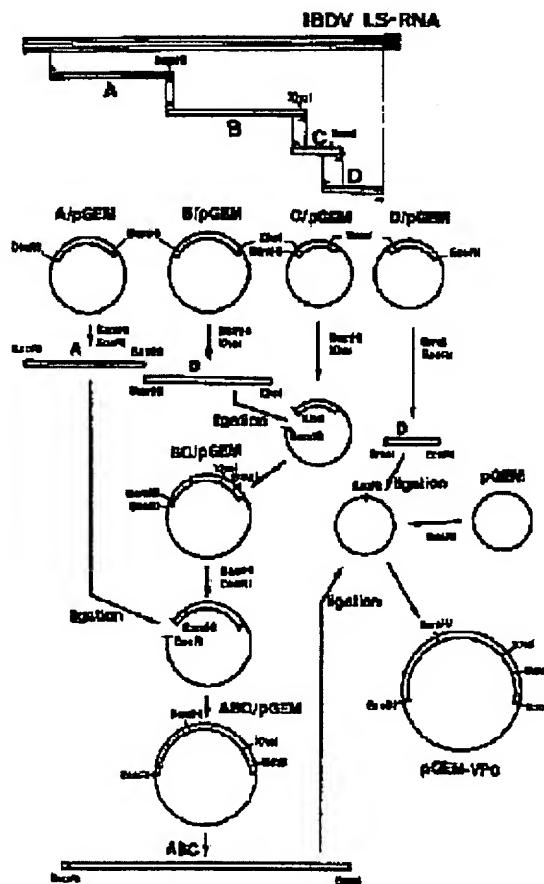
Priority number(s): JP19910339013 19911220

Report a data error here

## Abstract of JP5194597

**PURPOSE:**To obtain a vaccine effective on protection against infection of infectious bursal disease virus (IBDV), a producing method thereof and examining and diagnosing method for detecting existence of IBDV antibody in blood or body fluid of a chicken.

**CONSTITUTION:**A vector integrated with a gene coding all of cleavage type virus structural proteins (VP2, VP3 and VP4) of IBDV or at least either one thereof is manifested in a host cell and the obtained protein particles are used as an active ingredient to produce a vaccine. IBDV infection of a chicken is examined and diagnosed by immunologically detecting existence of IBDV in blood or body fluid of the chicken using the above-mentioned protein particles.



Best Available Copy

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/04		8619-4H		
A 6 1 K 39/12	A F E	8413-4C		
C 1 2 N 7/00		7236-4B		
C 1 2 P 21/02	Z N A C	8214-4B		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数4(全 15 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平3-339013

(22) 出願日 平成3年(1991)12月20日

(71) 出願人 000173865

財団法人日本生物科学研究所

東京都青梅市新町2221番地1

(72) 発明者 加藤 篤

東京都西多摩郡羽村町富士見平1-18 羽

村団地9-508

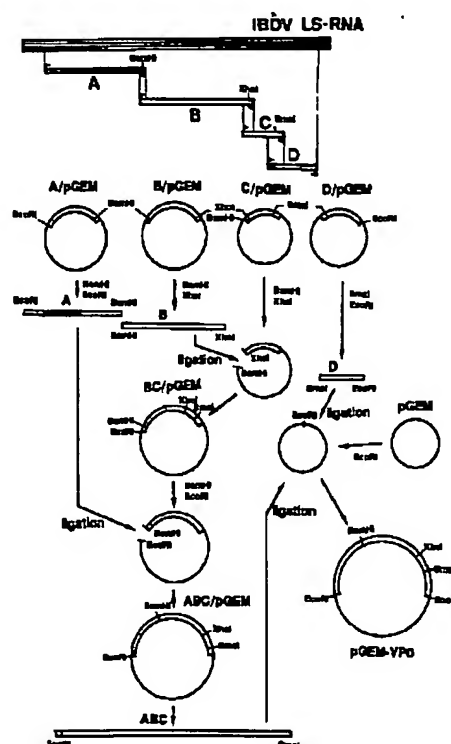
(74) 代理人 弁理士 本多 小平 (外4名)

(54) 【発明の名称】 防御抗原性を有する伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) の粒子製造法

(57) 【要約】

【目的】 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) の感染防御に有効なワクチン、及びその製造法、並びに上鶏の血液又は体液中の IBDV 抗体の存在を検出する検査診断方法を提供する。

【構成】 IBDV の開裂型ウイルス構造蛋白質 (VP 2, VP 3, VP 4) の全部又はこれらの少なくともいづれか一つをコードする遺伝子を組み込んだベクターを宿主細胞で発現させ、得られた蛋白質粒子を有効成分としてワクチンを製造する。また上記蛋白質粒子を用いて、鶏の血液又は体液中の IBDV 抗体の存在を免疫学的に検出することで鶏の IBDV 感染を検査診断する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの開裂型ウイルス構造蛋白質（VP-2、VP-4、VP-3）の全部、又は該開裂型ウイルス構造蛋白質のうちの（VP-2、VP-4、VP-3）の少なくともいずれか一つと、免疫学的に反応する部分を含むことを特徴とする蛋白質粒子。

【請求項2】 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）の開裂型ウイルス構造蛋白質の全部、又は該開裂型ウイルス構造蛋白質のうちの（VP-2、VP-4、VP-3）の少なくともいずれか一つの部分、をコードする遺伝子を組み込んだベクターを、宿主細胞に導入して発現させ、発現したIBDVの構造蛋白質を自己集合させることを特徴とする請求項1に記載の蛋白質粒子の製造法。

【請求項3】 請求項1に記載の蛋白質粒子を有効成分とする鶏の伝染性ファブリキウス嚢病に対する抗IBDVワクチン。

【請求項4】 請求項1に記載の蛋白質粒子を抗原として、被検体の鶏から採取した血液中又は体液中の成分とこの抗原とを免疫学的に反応させ、該血液中又は体液中のIBDV抗体の存在を免疫学的に検出することを特徴とする鶏のIBDV感染を検査診断する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ビルナウイウイルス科に属する伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）の開裂型ウイルス構造蛋白質（VP2、VP4、VP3）の全部、又はその一部から成る蛋白質粒子、その蛋白質粒子の製造法、及びその粒子の利用方法に関するものであり、更に詳しくは、IBDVを構成する蛋白質であるVP2、VP3、VP4の各蛋白質をコードする第一分節cDNA全域、若しくはその一部の遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入した細胞を培養し、発現させ、前駆体蛋白質を開裂させることにより得られる成熟蛋白質によって構成される粒子を製造する方法、そのようにして製造された粒子を有効成分とするワクチン、及び検査診断薬に関するものである。

## 【0002】

【発明の背景】 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）は1962年に初めて分離、報告されたウイルスである。本ウイルスは弱齢の鶏（3週齢以下）に対してファブリキウス嚢の萎縮を引き起こす。一般的には、この段階での死亡率は10%またはそれ以下でそれほど重大ではない。しかし、ファブリキウス嚢の萎縮に伴って鶏の免疫抑制が現れ、2次感染による死亡率は無視できない程に上昇する。本ウイルス病は現在、世界中に蔓延していると考えられているが、ワクチンが開発され、その計画的利用によりわが国での大規模な発生はしばらくの間収まっていた。近年、欧州で報告があった死亡率

の高い新しい型のIBDVの発生がわが国にも認められ、より効果的なワクチンが求められるようになっている。

【0003】 本病による養鶏業界の経済的損失を最小限度にとどめるには、多量の効果的で安価なワクチンの供給と接種されたワクチンが鶏に有効に働いたか否かを迅速に判定する検査が非常に重要である。現在までの細胞培養による製造方法では、人手にたよるところが多く大規模化、低価格化には限界がある。同様に、診断薬の安定供給と高品質化にも限界がある。

## 【0004】

【従来の技術】 ところで、従来のワクチン、診断法と組織換えウイルスについては以下の様にまとめられる。

## 【0005】 (1) IBDVワクチン

IBDV感染症の制御はワクチン接種に大きく基づいている。IBDVの発症防御は特に影響の大きい弱齢の鶏に対して重要である。当初は野外で流行しているウイルスの懸濁液をそのまま幼雛に接種することで野外の需要に対応していた【エドガー（Edgar）、S. A. とチョー（Cho）、Y.、ポウルトリ・サイエンス（Poult. Sci.）、44:1366（1965）、スネデッカー（Sunedeker）、C. ら、アビアン・ディーズ（Avian Disease）、11:519-528（1967）】。これらのワクチンは野外でのIBDVの発生を減少させるのには成功したが、ファブリキウス嚢の萎縮、体重減少と時には接種した鶏を死亡させたりした【エドガー（Edgar）、S. A. とチョー（Cho）、Y.、ポウルトリ・サイエンス（Poult. Sci.）、52:492-497（1973）】。そこでこれらのワクチンの使用はIBDVで汚染している地域で、且つ親鶏の雛への移行抗体がある場所に限定して使われることになった。

【0006】 その後、鶏胚や培養細胞に順化したウイルス株が副作用のない新しいワクチンとして期待とともに開発され始めた【ウィンターフィールド（Winterfield）、R. W. アビアン・ディーズ（Avian Disease）、13:548-557（1969）、ライナルディー（Rainaldi）、A. ら、アビアン・パソロジー（Avian Path.）、3:51-57（1974）、ルカート（Lukert）、P. D. ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・ベテリナリー・リサーチ（Amer. J. Vet. Res.）、36:539-540（1975）など】。しかしながら、こうして開発されたワクチンのうちのいくつかは幼雛に接種すると依然として臨床症状や、ファブリキウス嚢の障害を示した【ホプキンス（Hopkins）、I. G. ら、リサーチ・ベテリナリー・サイエンス（Res. Vet. Sci.）、27:260-261（1979）、エドワーズ（Edwards）、S. A. ら、リサーチ・ベテリナリー・サイエンス（R

es. Vet. Sci.), 32:79-83 (1982) ]。他のいくつかのワクチンは期待通りに弱毒化された。すなわち、臨床症状は全く示さず、ファブリキウス嚢の障害は全くないか非常に軽微であり、且つ免疫抑制作用を示さなかった [マスケット (Musket t)、J. C. ら、ベテリナリー・リサーチ (Vet. Res.), 104:332-334 (1979) ]。これらの弱毒化されたワクチンは移行抗体のない雛には非常に有効であった。ところが、移行抗体をもった雛にはワクチンが無力化される事が至る所で報告され始めた [マスケット (Musket t)、J. C. ら、ベテリナリー・リサーチ (Vet. Res.), 104:332-334 (1979)、イデ (Ide)、P. R.、カナディアン・ベテリナリー・ジャーナル (Can. Vet. J.), 20:35-40 (1979)、ウッド (Wood)、G. W. ら、アビアン・パソロジー (Avian Path.), 10:365-373 (1981) ]。

【0007】これらの結果は、弱毒化ワクチンの使用に関してジレンマを生じさせている。即ち、自分で抗体を産生できない頃の幼雛には親を免疫して移行抗体で病気を防止できるが、移行抗体のある雛をワクチンで免疫することはできないので、移行抗体の消失する頃からの感染が問題になる。一方、移行抗体のない幼雛は抗体産生のできる頃からの免疫は可能であるが、それ以前の頃の感染が問題になる。また、移行抗体のある幼雛に対しては病原性の残っているワクチン株を使うことにより、免疫を与えることが可能であるが、実際には野外で移行抗体のレベルを1羽毎に測定するのは不可能であり、すべての鶏にこのワクチンを投与すると移行抗体価の低い固体にワクチン自身の副作用が現れてしまう弊害がある。

#### 【0008】(2) 診断法

IBDVの診断は通常ファブリキウス嚢からのウイルス分離と血清学的な試験によって行なわれている。血清学的診断法としてはファブリキウス嚢の乳剤を抗原として用いたゲル内沈降反応と蛍光抗体法が古くから用いられている [イデ (Ide)、P. R.、カナディアン・ジャーナル・オブ・コンパラティブ・メディスン (Can. V. Comp. Med.), 39:183-190 (1975) ]。また、ウイルス中和抗体価の測定も診断法として利用されている [フィリップス (Phillips)、W. E. Jr.、アビアン・ディジーズ (Avian Disease) 25:1093-1097 (1981) ]。高感度血清診断法としてELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) も近年ではよく利用されている [マーカッド (Marquardt)、W. W. ら、アビアン・ディジーズ (Avian Disease) 24:375-385 (1980) ]。迅速で簡単に再現性の高い判定方法として向流電気泳動法も試みられて

いる [バーグ (Berg)、N. W.、アビアン・パソロジー (Avian Path.) 11:611-614 (1982) ]。

【0009】ウイルスの検出や量を測定する手段として、鶏に感染させID<sub>50</sub>を求める方法や発育鶏卵に感染させEID<sub>50</sub>が用いられている。近年、より短時間で感度よく測定できる方法としてウイルスの核酸を検出するDNAプローブ法が報告されている [デイビス (Davis)、V. S. とボイル (Boyle)、J. A.、アビアン・ディジーズ (Avian Disease) 34:329-335 (1990)、ヘンダーソン (Henderson)、K. S. とジャックウッド (Jackwood)、D. J.、アビアン・ディジーズ (Avian Disease) 34:744-748 (1990)、ジャックウッド (Jackwood)、D. J.、ベテリナリー・マイクロバイオロジー (Vet. Microbiol.) 24:253-260 (1990) ]。また、この技術の延長としてPCR (Polymerase Chain Reaction) の応用も考えられている [デイビス (Davis)、V. S. とボイル (Boyle)、J. A.、アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.) 189:35-39 (1990) ]。

#### 【0010】(3) 組換えウイルス

IBDVの主要なウイルス構成蛋白質をコードする第一分節の遺伝子配列はいくつかの株で報告されている [ハドソン (Hudson)、P. J. ら、ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nuc. Acid Res.) 14:5001-5012 (1986)、キーベンジ (Kibenge)、F. S. B. ら、ジャーナル・オブ・ジェネラル・ビロロジ (J. Gen. Virol.) 71:569-577 (1990)、ベイリス (Bayliss)、C. D. ら、ジャーナル・オブ・ジェネラル・ビロロジ (J. Gen. Virol.) 71:1303-1312 (1990) ]。その内、IBDVの002-73株のcDNA断片が大腸菌 [アザッド (Azad)、A. A. ら、ビロロジ (Virology) 149:190-198 (1986)、アザッド (Azad)、A. A. ら、ビロロジ (Virology) 161:145-152 (1987)、特表平3-500601] や酵母 [マックレディ (Macreadie)、I. G. ら、ワクチン (Vaccine) 8:549-552 (1990) ] を宿主として蛋白質発現に用いられている。発現した蛋白質はいずれも有効成分としてVP2蛋白質あるいはその1部を含み、鶏にウイルス中和抗体を誘導することができ、この抗体を受動的に他の鶏に移すとその鶏をIBDVの感染から防御することが報告されている。

#### 【0011】

【発明が解決しようとする課題】従来の方法によるIB

DVのワクチン製造には、生ワクチンと不活化ワクチンの2種類の物がある。生ワクチンの場合には接種量が少なくすむという長所があるものの、厳密な安全性と有効性及び使用方法の検討が重要になる。一方、不活化ワクチンの場合には安全性が高いという長所があるが、ウイルスの有効成分を破壊せずに効果的に不活化する検討や十分な免疫を与えるためにはかなりの量が必要になり、最小有効量試験が重要になる。こういった基準を達成して、使用されている現在のワクチンは疾病の予防に効果をあげているものの、依然として小数の鶏には生ワクチン使用による副作用や不十分な不活化ワクチン接種による病気の発生が知られている。また、企業努力による製品の価格低下にも、このような時間と人手のかかる製法では限界があると考えられる。また、最近野外では接種にかける手間を減らすために多価ワクチンを望む声が大い。そうした多価ワクチンに対応するためには効力が高く、安定性があり、安全性の高いワクチン製造が必須になるが、こうしたワクチン開発はかなり高価なものになろう。

【0012】また、現在のIBDV検査の主流は中和抗体価の検査とELISAであるが、中和抗体の測定は非常に感度が高く、特異性が高いという長所があるものの、鶏胚初代継代細胞を使うため、簡便性にかける欠点がある。また、この検査には数日を要し、たとえば、中和抗体検査に使うウイルスと実際に鶏が感染したウイルスが抗原的にかけ離れていると検定できないという欠点を持っている。ELISAによる抗体検査は簡便で再現性が高く、比較的中和抗体価との関連も高いということで利用が多い。ところが、ELISAに用いる抗原にはIBDVを増やして抗原を調製しているため、いくつかの問題点が指摘できる。非特異的な抗体との反応を防ぐためにはウイルスをかなり精製しなければならないが、安定的に高純度のウイルスを製造することは困難であり、できても非常に高いものになってしまう。現在、核酸を利用した優れたウイルス同定法が開発されているが、こういった技法は実験室レベルでの診断には利用されるだろうが、実際には野外を含めて抗体検査の方が需要は大きい。

【0013】組換えDNA技法は感染ウイルスを使わないで安全に大量のワクチンを製造できる方法であるが、現在の報告段階では量的にも、効力的にも不十分であり、おおいに改良の余地がある。

【0014】そこで以上のような問題点を鑑み、本発明者はかかる従来技術の下で、鋭意研究を重ね、IBDVの不活化ワクチンであるIQ株の第1分節遺伝子のcDNAを作製し、組換えバキュロウイルスを構築した。組換えバキュロウイルス感染細胞内では挿入したIBDV由来遺伝子からの蛋白質の発現が見られた。この蛋白質は感染細胞中に蓄積するのみならず、培養上清に粒子状に産生されることを見出した。すなわち、IBDV

cDNA組換えバキュロウイルス感染細胞の培養液中には、粒子状に自己集合したIBDV抗原蛋白質が多量に放出されていた。この粒子を鶏に免疫原として接種したところIBDVの感染から鶏を防御することが認められた。また、同様にこの粒子をELISAの抗原として用いたところ、IBDVに対する中和抗体価とこのELISAの値に相関関係が高いことが見いだされた。かかる知見に基づいて本発明を完成するに至ったものであり、本発明の目的は、上記の手法に基づいて防御抗原性を有するIBDVの粒子状構成蛋白質の製法を提供するものである。

【0015】

【課題を解決するための手段】上記した目的の実現のためになされた本発明の防御抗原性を有するIBDVの粒子状構成蛋白質の製法の特徴は、IBDVの第1分節cDNAを組み込んだ組換えバキュロウイルスを感染させた細胞の培養上清中に発現蛋白質が自己集合した粒子が大量に放出され、この放出粒子にIBDVに対する防御免疫原性があるというものである。

【0016】本発明においてベクターに組み込まれる遺伝子はIBDVに分類されるウイルスならば特に株の限定はされないが、特に002-73株[フィルス(Firth)、K. J.、オーストラリアン・ベテリナリー・ジャーナル(Aust. Vet. J.)、50:128-130(1974)、ST-C株[ローゼンバーガー(Rosenberger)、J. K.ら、アビアン・ディーズ(Avian Disease) 19:717-729(1975)]、52/70株[バイグレイブ(Bygrave)、A. C.とファラー(Faragher)、J. T.、ベテリナリー・リコード(Veterinary Record 86:758-759(1970)]などの強毒株、ウズラや鶏の発育卵や培養細胞などに順化した弱毒株等があげられる。

【0017】本発明においてIBDV遺伝子とは、特にIBDVが有する2分節の2本鎖RNAゲノムのうちの長い方の分節、すなわち第1分節の全体、あるいはその1部または変異物や改変物をいい、実質的に自己開裂するウイルス蛋白質をコードしている塩基配列を示す。この遺伝子は特に感染臓器、感染培養細胞あるいはその上清から得たIBDVからcDNAを公知の方法により逆転写酵素を利用して逆転写して得たのではなく、化学的に人工合成したものであっても実質的にコードする遺伝子がIBDVの蛋白質に対応するものであれば構わない。

【0018】本発明において用いるベクターは、宿主細胞(菌)内で蛋白質を発現させることのできるものであれば特に限定はされなが、用いられるベクターの具体例としてはpGEM-EX、pTac、pKK233などの大腸菌発現ベクター、pPL-入などの大腸菌ファー

ジ系ベクター、pSVL、pKSV、pMAMなどの大腸菌培養細胞シャトルベクター、またはワクチニア、バキュロ等のウイルスベクターなどが例示される。

【0019】本発明においてIBDV遺伝子を組込んだ発現ベクターで形質転換された宿主細胞は、挿入した開裂蛋白質前駆体が発現され、自己開裂して各々の成熟蛋白質（VP2、VP3、VP4）へとプロセッシングされていく。自己開裂は大腸菌の内部でも〔ジャガディッシュ（Jagadish）、M. N. ら、ジャーナル・オブ・ピロロジー（J. Virol） 62:1084-1087（1988）〕、真核生物の細胞内でも観察される。開裂した各々の蛋白質はIBDVが感染した鶏の細胞内でウイルス構成蛋白質が集合してウイルス粒子を作るがごとく自己集合して粒子を形成する。この時、宿主として大腸菌あるいは酵母を選んだ場合は細胞内に粒子が蓄積するが、動物培養細胞や昆虫細胞を選んだ場合は、IBDVが感染細胞から放出されるがごとく細胞培養液中に粒子が放出されてくる。宿主細胞の培養方法は細胞を培養できるものであるならば特に限定されないが、培養フラスコによる静置培養、ローラーボトルによる回転培養、スピナーフラスコ等による懸濁培養等が例示できる。

【0020】本発明における発現組換え蛋白質は細胞内または細胞培養液中あるいはその両方に得られ、この発現蛋白質の精製は発現蛋白質が自己集合して粒子を形成する性質を利用して遠心分離、ゲル濾過カラム、電気泳動などの手法により簡単に単離することができる。発現組換え蛋白質をIBDV用ワクチンとして用いるには、特に濃縮あるいは精製の操作なしに感染細胞の抽出物あるいは感染培養上清をそのまま使用しても防御効果が得られるが、より好ましくは精製粒子を用いたほうがよい。鶏には公知の方法により免疫ができ、磷酸アルミニウムゲルアジュバント、水酸化アルミニウムゲルアジュバント、オイルアジュバントと混合して免疫する方法が例示できる。検査用の抗原として発現組換え蛋白質を用いるにも感染細胞の抽出物あるいは感染培養上清を用いることができるが、検査時の好ましからぬ反応をなくするために精製粒子の使用が勧められる。検査の方法としては抗原を固相化させたELISAによる発色あるいは発光による測定法、RIAによる放射活性測定法、ラテックス粒子による凝集反応法、対向電気泳動法、ゲル内沈降反応法などが例示される。

【0021】

【作用】特表平3-500601で示されたVP2単身、あるいはエピトープの一部を用いた利用法は抗原の安定性、あるいは抗原を精製する方法に困難が見いだされるが、本発明の粒子はより物理化学的に安定であり、より好ましくは精製が非常に容易な事である。このためワクチンとして利用するにあたって、いくつかの特長が容易に推定できる。

【0022】1. 構造がウイルス粒子と似通っているために抗原刺激が接種された動物に対してウイルス粒子で免疫したのと同様に効率的に行われる。

【0023】2. 安定な構造をしていることから接種された動物の体内で分解しにくく、抗原刺激がウイルス粒子で免疫したのと同様に長期にわたっておこなわれる。

【0024】3. 大量発現が可能なおことからより低価格でワクチンを製造できる。

【0025】4. 簡単な工程で濃縮できることから接種量の少ないワクチンを製造でき、接種労力が軽減される。

【0026】5. 簡単な工程で精製できることから接種時の好ましからざる副反応を抑えることができる。以上のような長所から、本組換え発現蛋白質を用いたワクチン製造法はワクチン製造会社とワクチン使用者に非常に有効な手段を提供するものである。

【0027】また、抗体検査試薬用抗原として利用するにあたって同様にいくつかの長所が容易に推定される。

【0028】1. 大量の抗原を提供でき、多くの検査に対応できる。

【0029】2. 抗原の濃縮が簡単な工程でおこなえ、品質の均一性を保て、広範囲な検査法に応用できる。

【0030】3. 簡単な工程で精製できることから、供雑物による検査時の好ましからざる反応を抑えることができ、検査精度を向上させ得る。

【0031】4. 構造がウイルス粒子と似通っているために、ウイルス粒子を抗原に用いたときと同様に立体構造を認識するような抗体とも反応し、検査精度を落とすことはない。以上のうような特長から、本組換え発現蛋白質を用いた検査試薬用抗原製造法はIBDVワクチン非接種地域においては広範囲にIBDVの発生状況調査を、IBDVワクチン接種地域においては免疫が成立しているかどうかを調査する手段を提供するものである。

【0032】

【実施例】以下に本発明を図面に示す実施例に基づいて説明する。

【0033】なお本例では配列番号1の塩基配列を有するIBDVのIQ株を用いた。

【0034】(1) IBDV第一分節cDNAの作製（図1参照）

培養細胞に順化したIBDVのIQ株を培養上清から遠心分離により精製し、プロテアーゼK消化後にウイルス遺伝子RNAを常法によりフェノール、クロロホルム抽出した。すでに報告されているIBDV各株の塩基配列

〔ハドソン（Hudson）、P. J. ら、ヌクレック・アシッド・リサーチ（Nuc. Acid Res.） 14:5001-5012（1986）、キーベンジ（Kibenge）、F. S. B. ら、ジャーナル・オブ・ジェネラル・ピロロジー（J. Gen. Vi

rol.) 71:569-577 (1990)、ベリス (Bayliss)、C. D. ら、ジャーナル・オブ・ジェネラル・ビロロジ (J. Gen. Virol.) 71:1303-1312 (1990)] を基に約500ベース間隔で18ベースのプライマーをDNA合成機 (ミリジェン社製) で自動化学合成した。このプライマーを用いてIBDVより抽出したRNAを鋳型として常法通りに逆転写酵素でcDNAを作製した。得られたcDNAを複製の忠実度にすぐれたベントDNAポリメラーゼ (ニューイングランドバイオラボ社製) を用いて、95℃1分、50℃2分、72℃5分で15サイクルのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行いcDNAを増幅させた。この結果、IBDVの第一分節遺伝子は4つの部分的に重なりあったcDNAとして得られた。

【0035】 (2) IBDV第一分節cDNAのクローニング (図1参照)

この増幅cDNAの末端をクレノー酵素 (ベリンガーマンハイム社製) で処理し、末端を平滑化し、続いてポリヌクレオチドカイネース (東洋紡社製) にて末端をリン酸化した。クローニングベクターとしてpGEM-3Z (プロメガ社製) を制限酵素Sma Iで完全消化後、バクテリアルアルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) を用いて末端を脱リン酸化させた。このベクターと増幅cDNAを等量混合しT4DNAライゲース (ベリンガーマンハイム社製) を用いて結合させ、続いて大腸菌JM109株を形質転換させてそれぞれの組換え体を得た。4種類に分断されてクローニングされたcDNAをそれぞれに特異的な制限酵素を用いて常法に乗っ取って切断と再結合を繰り返す、ひとつながりにつなぎ合わされた再構築組換えベクターpGEM-VP0を得た。pGEM-VP0が正しく再構築されたかどうかはダイデオキシ法で塩基配列を決定することにより確認した。

【0036】 (3) 組換えバキュロウイルス作製用トランスファーベクターへの再クローニング (図2参照)

バキュロウイルストランスファーベクターpAcYM1を制限酵素Sma Iで切断後、バクテリアルアルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) を用いて末端を脱リン酸化させた (pAcYM1/Sma I/BAP)。pGEM-VP0を制限酵素EcoRIで切断後、末端をクレノー酵素 (ベリンガーマンハイム社製) で処理し、末端を平滑化した。さらに、IBDVのcDNA断片 (VP0) とpGEM部分をアガロースゲル電気泳動で分離し、VP0DNA部分のみをゲルから単離した。pAcYM1/Sma I/BAPとVP0DNAを等量混合し、常法に従い大腸菌を形質転換して組換え体pAcYM1-VP0を得た。

【0037】 (4) 組換えバキュロウイルスの作出

252のカルチャーボトルに培養されたSf21細胞にバキュロウイルス (AcNPV) を0.1pfu/ce

11で細胞に感染させ、45分後に前記組換えプラスミッドpAcYM1-VP0DNAを磷酸カルシウム法で細胞にトランスフェクションした。その後、28℃で96時間細胞を静置培養し、その培養上清を採取し4℃で保存した。続いて、採取した培養上清を100倍から1万倍に希釈して、直径3.5のペトリ皿に培養したSf21細胞、約106個に感染させ、1.5%のアガロースゲルを重層した。72時間静置培養後、上から0.5%ニュートラルレッドを滴下し、さらに24時間培養を続けた。感染後、96時間でペトリ皿内の細胞にはウイルス感染による明瞭なブラックが出現した。組換えバキュロウイルスは外来遺伝子が挿入されるとポリヘドリン蛋白質の発現が無くなることから、ニュートラルレッドで染まっていないポリヘドリン欠損ブラックをバスツールピペットで単離して、スクリーニングとクローニングをおこなった。続いて、得られた組換えバキュロウイルスのクローンをSf21細胞に再び感染させ、96時間後の感染細胞をSDS電気泳動にかけたところ、挿入した遺伝子に相当する産物が蛋白質のバンドとして認められることが確認され、このクローンをrAcNPV-VP0と命名した。

【0038】 (5) 組換えバキュロウイルスの発現

rAcNPV-VP0をSf21細胞に10pfu/ce11で感染させると24時間目から48時間にわたって感染細胞内、培養上清に多くの発現蛋白質が認められた。発現した蛋白質はジャガディッシュ (Jagadish)、M. N. ら [ジャーナル・オブ・ビロロジ (J. Virol) 62:1084-1087 (1988)] が大腸菌で報告したのと同様に感染Sf21細胞内でも前駆体蛋白質 (VP0) が自己開裂し、それぞれの蛋白質 (VP2、VP3、VP4) に成熟していることが認められた (図3Aレーン2)。これらの蛋白質はIBDVに感染した鶏の血清と反応することから (図3Bレーン5と7参照)、もともとのウイルスの抗原性を保持していると考えられた。このような蛋白質は非感染のSf21細胞 (図3Aレーン3参照) や野生型のバキュロウイルス感染細胞 (図3Aレーン1参照) にはいっさい認められなかった。さらに、培養上清中に見られる蛋白質も同様に成熟しており、細胞内で自己開裂した後、細胞外に放出されたと考えられた (図3Bレーン2と6参照)。この培養液中にみられる成熟蛋白質は15000回転、15分の遠心で沈澱部分に回収されることから、塊をつくっていることが推定された。そこでこの培養上清を15%と60%のシュクロースステップ密度勾配に重層し、TST28ローター (コントロン社製) で25000回転で2時間遠心した。遠心後、各分画に組換え蛋白質があるかどうかをSDS-ゲル電気泳動にて確認したところ、最上層分画 (図4レーン5参照) や15%層分画 (図4レーン6参照) には認められなかったが、60%層分画には組換え蛋白質が認められた



(図4レーン7参照)。このような蛋白質は野生型のバキキュロウイルス感染細胞の培養上清を同様の処理をしても見られなかった(図4レーン2~4参照)。そこで、この分画を常法によりメンブラン上でネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察したところ、非常に大きな中空の粒子構造が認められた(図5A~C参照)。このような粒子は同様な精製方法で得られるバキキュロウイルス粒子(図5D~E)とは異なっており、発現蛋白質由来であることが判った。

【0039】(6)発現粒子構造物の防御免疫原性(表1参照)

AcNPV-VP0感染細胞の培養上清を48時間後に採取して遠心分離し、粒子構造物を粗精製した。これを抗原として3週齢のSPF鶏(日生研社製)4羽に10 $\mu$ gを、さらに4羽にはその1/10量の1 $\mu$ gをフロイドのコンプリートアジュバントと共に初回免疫した。また、陽性対照として市販のIBDV不活化ワクチン(日生研社製)を用法に従って鶏4羽に免疫し、陰性対照として非免疫鶏4羽を他に準備した。2週後に再び同様に2回目の免疫を行った。その2週後に50EID

50のI株IBDVで全鶏を攻撃した。攻撃後、1週目に鶏を解剖し、攻撃ウイルスによるファブリキウス囊(以下「F囊」と略記する)の組織病変を比較した。

【0040】非免疫鶏4羽はいずれも攻撃により著しいF囊の萎縮が認められ、F囊体重比は1.4から2.4の値を示した。一方市販のIBDVワクチンを接種した4羽中3羽はまったく萎縮が認められず、F囊体重比は3.5から9.1の値を示し、病理解剖学的にも正常であった。残りの1羽はわずかながら萎縮が認められたものの組織の色は正常と変わり無かった。発現粒子10 $\mu$ gで免疫した鶏4羽はいずれもF囊の萎縮は認められず、F囊体重比は4.5から12.5の値を示した。発現粒子1 $\mu$ gで免疫した鶏4羽については、その内2羽にはF囊の萎縮が認められなかったが、残りの2羽には萎縮が認められた。このことより、組換えにより発現した粒子構造物は鶏にIBDVに対する防御能を付与することが明かとなった。また、その防御能の与え方には抗原量依存性があることが示された。

【0041】

【表1】

表 1

実験群		体重 <sup>*1</sup>	F囊重量 <sup>*2</sup>	F囊体重比 <sup>*3</sup>	防御
非免疫 陰性対照群	1	0.88	2.04	2.32	0/4
	2	0.60	1.30	2.17	
	3	0.57	1.38	2.42	
	4	0.70	0.98	1.40	
組換え蛋白質 1 $\mu$ g免疫群	1	0.59	1.20	2.03	2/4
	2	0.79	2.43	3.08	
	3	0.62	2.91	4.69	
	4	0.82	1.77	2.21	
組換え蛋白質 10 $\mu$ g免疫群	1	0.75	3.37	4.49	3/4
	2	0.59	7.40	12.50	
	3	0.82	4.71	5.74	
	4	0.71	4.14	5.84	
市販ワクチン 接種陽性対照群	1	0.60	3.36	5.60	4/4
	2	0.63	5.75	9.13	
	3	0.79	2.14	2.71	
	4	0.70	2.43	3.47	

\*1: 体重はkg単位で示してある。

\*2: F囊重量はg単位で示してある。

\*3: F囊体重比はF囊重量(g)を体重(kg)で割った値である。



【0042】(7) 発現蛋白質を用いた抗体検査(表2参照)

rAcNPV-VP0を感染させたSf21細胞の培養上清を48時間目に採取し、同様に遠心分離により発現組換え粒子構造物を精製した。この蛋白質を常法に従いELISA用プレート(ファルコン社製)に一つの穴(ウエル)あたり0.1 $\mu$ gになるように50mM炭酸緩衝液で希釈し、凍結乾燥法でプレートに抗原を固相化した。使用直前に3%スキムミルクで各ウエルを37℃、1時間ブロッキングしたのち、抗体検査に用いた。10 用いた抗体として予め中和抗体価の解っている鶏免疫血清を使用した。それぞれの中和抗体価は常法によりブラック減少法により測定した。

【0043】ブロッキング液を洗い流した後、それぞれの抗体を生理磷酸緩衝液(PBS)で200倍から2倍段階希釈し、各ウエルに50 $\mu$ lづつ加え、37℃、1時間反応させた。続いて、抗体希釈液を洗い流し、西洋\*

\*ワサビのパーオキシダーゼ(HRPO)標識された抗鶏イムノグロブリン抗体を加え、再び37℃で1時間反応させた。未反応の標識抗体を洗い流した後、酵素の発色試薬(ABTS)と過酸化水素を加えて発色させた。発色の程度はプレートリーダー(インターメッド社製)を用いて測定した。その結果、中和抗体価4096倍の鶏血清では800倍希釈までが非常に強く反応し、測定値は2以上になった。一方、中和抗体価1024倍の鶏血清は200倍希釈までが非常に強く反応し、測定値は2以上になった。ところが、中和抗体価4倍以下の鶏血清は200倍希釈ではほとんど発色を示さなかった。以上の事からIBDVに対する抗体価を測定するための抗原としてもこの組換え発現蛋白質は有効であることが判明した。

【0044】

【表2】

表 2

鶏個体番号	中和抗体価	血 清 希 釈 倍 率				
		200	400	800	1600	3200
1	4096	>2	>2	>2	>2	1.9
2	4096	>2	>2	>2	1.6	1.1
3	4096	>2	>2	>2	>2	1.5
4	1024	>2	1.9	1.4	0.9	0.6
5	4	1.4	1.0	0.6	0.5	0.4
6	<4	1.4	0.9	0.5	0.4	0.3
7	<4	0.8	0.6	0.4	0.3	0.3
8	<4	0.7	0.6	0.4	0.3	0.3

各血清希釈における値はELISAの結果現れた発色の度合を吸光度計(プレートリーダー)で測定した値である。

【0045】

配列の型: 核酸

【配列表】配列番号: 1

配列

```

      10      20      30      40      50      60
AGTAGAGATCAGACAAACGATCGCAGCGATGACAAACCCGTCAGATCAAGCCCAACAGAT
                               MetThrAsnProSerAspGlnAlaGlnGlnIle
      70      80      90     100     110     120
TGTTCCGTTTATACGGAGCCTTCTGATGCCAACAACCGGACCGCGTCCATTCGGACGA
ValProPhelleArgSerLeuLeuMetProThrThrGlyProAlaSerIleProAspAsp

```

15  
 130 140 150 160 170 180  
 CACCCGAGAGCAACTCTCAGGTCGGAGACTTCAACCTACAATTGACTGTGGGGA  
 ThrLeuGluLysHisThrLeuArgSerGluThrSerThrTyrAsnLeuThrValGlyAsp  
 190 200 210 220 230 240  
 CACAGGGTCAGGGCTAATTGTCTTCTCCCTGGATTCCCTGGATCAATTGTGGGTGCTCA  
 ThrGlySerGlyLeuIleValPhePheProGlyPheProGlySerIleValGlyAlaHis  
 250 260 270 280 290 300  
 CTACACACTGCAGAGCAATGGGAATACAAGTTCGATCAGATGCTCCTGACTGCCAGAA  
 TyrThrLeuGlnSerAsnGlyAsnTyrLysPheAspGlnMetLeuLeuThrAlaGlnAsn  
 310 320 330 340 350 360  
 CCTACCGGCCAGTTACAATACTGCAGGTTAGTGAGTCGGAGTCTCACAGTGAGGTCAAG  
 LeuProAlaSerTyrAsnTyrCysArgLeuValSerArgSerLeuThrValArgSerSer  
 370 380 390 400 410 420  
 CACACTCCCTGGTGGCGTTTATGCACTAAACGGCACCGTAAACGCCGTGACCTTCCAAGG  
 ThrLeuProGlyGlyValTyrAlaLeuAsnGlyThrValAsnAlaValThrPheGlnGly  
 430 440 450 460 470 480  
 AAGCCTGAGTGAAGTACAGATGTTAGCTACAATGGGTTGATGTCTGCAACGGCCAACAT  
 SerLeuSerGluLeuThrAspValSerTyrAsnGlyLeuMetSerAlaThrAlaAsnIle  
 490 500 510 520 530 540  
 CAACGACAAAATTGGGGATGTCCTGGTAGGGGAAGGGGTACCGTCTCAGCCTACCCAC  
 AsnAspLysIleGlyAspValLeuValGlyGluGlyValThrValLeuSerLeuProThr  
 550 560 570 580 590 600  
 ATCATATGATCTTGGGTATGTGCGACTTGGTGACCCCATTCCTGCTATAGGGCTTGACCC  
 SerTyrAspLeuGlyTyrValArgLeuGlyAspProIleProAlaIleGlyLeuAspPro  
 610 620 630 640 650 660  
 AAAAAATGGTAGCCACATGTGACAGCAGTGACAGGCCAGAGTCTACACCATAACTGCAGC  
 LysMetValAlaThrCysAspSerSerAspArgProArgValTyrThrIleThrAlaAla  
 670 680 690 700 710 720  
 CGATGATTACCAATCTCATCACAGTACCAATCAGGTGGGTAACAATCACACTGTTCTC  
 AspAspTyrGlnPheSerSerGlnTyrGlnSerGlyGlyValThrIleThrLeuPheSer  
 730 740 750 760 770 780  
 AGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTAAGCGTTGGAGGAGAGCTCGTGTCAAACAAG  
 AlaAsnIleAspAlaIleThrSerLeuSerValGlyGlyGluLeuValPheLysThrSer  
 790 800 810 820 830 840  
 TGTCCATAGCCTTGTACTGGGCGCCACCATCTATCTTATAGGATTGTGGGACTACGGT  
 ValHisSerLeuValLeuGlyAlaThrIleTyrLeuIleGlyPheAspGlyThrThrVal  
 850 860 870 880 890 900  
 AACCACCAGAGCTGTGGCCGGAACAATGGGCTGACGACTGGCACCAGACAATCCTATTCC  
 ThrThrArgAlaValAlaAlaAsnAsnGlyLeuThrThrGlyThrAspAsnProIlePro  
 910 920 930 940 950 960  
 ATTCAATCTTGTGTTCCGACCCATGAGATAACCCAGCCAATCACATCCATCAAACTGGA  
 PheAsnLeuValPheProThrHisGluIleThrGlnProIleThrSerIleLysLeuGlu  
 970 980 990 1000 1010 1020  
 GATAATGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAAGCTGGGGATCAGATGTCATGGTCGGCAAGTGG  
 IleMetThrSerLysSerGlyGlyGlnAlaGlyAspGlnMetSerTrpSerAlaSerGly  
 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
 GAGCCTAGCAGTGACAATCCATGGTGGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTCCCGTCACACT  
 SerLeuAlaValThrIleHisGlyGlyAsnTyrProGlyAlaLeuArgProValThrLeu  
 1090 1100 1110 1120 1130 1140  
 AGTAGCCTACGAAAGAGTGGCAACAGGATCCGTCGTTACAGTCGCTGGGGTGAGCAACTT

17

18

ValAlaTyrGluArgValAlaThrGlySerValValThrValAlaGlyValSerAsnPhe  
 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 CGAGTGATCCCAATCCGAACTAGCAAAGAACCTGGTTACAGAATACGGCCGATTGA  
 GluLeuIleProAsnProGluLeuAlaLysAsnLeuValThrGluTyrGlyArgPheAsp  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 CCCAGGAGCCATGAACACACAAAATTGATACTGAGTGAGAGGGACCGTCTTGGCATCAA  
 ProGlyAlaMetAsnTyrThrLysLeuIleLeuSerGluArgAspArgLeuGlyIleLys  
 1270 1280 1290 1300 1310 1320  
 GACCGTCTGGCCAACAAGGGAGTACACTGACTTTCGTGAGTACTTCATGGAAGTGGCTGA  
 ThrValTrpProThrArgGluTyrThrAspPheArgGluTyrPheMetGluValAlaAsp  
 1330 1340 1350 1360 1370 1380  
 CCTCAACTCTCCCTGAAGATTGCAGGAGCATTTGGCTTCAAGACATAATCCGGGCCAT  
 LeuAsnSerProLeuLysIleAlaGlyAlaPheGlyPheLysAspIleIleArgAlaIle  
 1390 1400 1410 1420 1430 1440  
 AAGGAGGATAGCTGTGCCGGTGGTCTCTACATTGTTCCACCTGCCGCTCCCTAGCCCA  
 ArgArgIleAlaValProValValSerThrLeuPheProProAlaAlaProLeuAlaHis  
 1450 1460 1470 1480 1490 1500  
 TGCAATTGGGGAAGGTGTAGACTACCTGCTGGCGCATGAGGCACAAGCTGCTTCAGGGAC  
 AlaIleGlyGluGlyValAspTyrLeuLeuGlyAspGluAlaGlnAlaAlaSerGlyThr  
 1510 1520 1530 1540 1550 1560  
 TGCTCGAGCCGCTCAGGAAAAGCAAGAGCTGCCTCAGGTCGCATAAGGCAGCTGACTCT  
 AlaArgAlaAlaSerGlyLysAlaArgAlaAlaSerGlyArgIleArgGlnLeuThrLeu  
 1570 1580 1590 1600 1610 1620  
 CGCCGCTGACAAGGGGTACGAGGTAGTCGCGAATCTATTCCAGGTGCCCCAGAATCCCGT  
 AlaAlaAspLysGlyTyrGluValValAlaAsnLeuPheGlnValProGlnAsnProVal  
 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
 AGTCGACGGGATTCTTGCTTCACCTGGGGTACTTCGCGGTGCACACAACCTCGACTGCGT  
 ValAspGlyIleLeuAlaSerProGlyValLeuArgGlyAlaHisAsnLeuAspCysVal  
 1690 1700 1710 1720 1730 1740  
 GCTAAGGTGGGGCGCCACGCTATTCCCTGTGGTCATTACGACAGTGGGAAGCGCCATGAC  
 LeuArgValGlyAlaThrLeuPheProValValIleThrThrValGluAspAlaMetThr  
 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
 ACCCAAAGCACTGAACAGCAAAATGTTTGCTGTCATTGAAGGCGTGCAGAGAAGACCTCCA  
 ProLysAlaLeuAsnSerLysMetPheAlaValIleGluGlyValArgGluAspLeuGln  
 1810 1820 1830 1840 1850 1860  
 ACCTCCATCTCAAAGAGGATCTTTCATACGAACTCTCTCCGGACATAGAGTCTATGGATA  
 ProProSerGlnArgGlySerPheIleArgThrLeuSerGlyHisArgValTyrGlyTyr  
 1870 1880 1890 1900 1910 1920  
 TGCTCCAGATGGGGTGCTTCCACTGGGAGACTGGGAGAGACTACACTGTTGTCCCAATAGA  
 AlaProAspGlyValLeuProLeuGluThrGlyArgAspTyrThrValValProIleAsp  
 1930 1940 1950 1960 1970 1980  
 TGATGTCTGGGACGACAGCATTATGCTGTCCAAAGACCCATTCTCTATTGTGGGAAA  
 AspValTrpAspAspSerIleMetLeuSerLysAspProIleProProIleValGlyAsn  
 1990 2000 2010 2020 2030 2040  
 CAGTGGCAACCTAGCCATAGCCTACATGGATGTGTTTCGACCCAAAGTCCCATCCATGT  
 SerGlyAsnLeuAlaIleAlaTyrMetAspValPheArgProLysValProIleHisVal  
 2050 2060 2070 2080 2090 2100  
 GGCTATGACAGGAGACCTCAACGCTTGGGGCGAGATTGAGAAAGTAAGCTTCAGAAGCAC  
 AlaMetThrGlyAspLeuAsnAlaTrpGlyGluIleGluLysValSerPheArgSerThr  
 2110 2120 2130 2140 2150 2160

19

20

CAAGCTCGCCACTGCACACCGACTTGGCCTCAGGTTGGCTGGTCCCGGAGCATTCGATGT  
 LysLeuAlaThrAlaHisArgLeuGlyLeuArgLeuAlaGlyProGlyAlaPheAspVal  
 2170 2180 2190 2200 2210 2220  
 AGACACCGGGCCCAACTGGGCAACGTTTCATCAACGCTTCCCCACAATCCACGCGACTG  
 AspThrGlyProAsnTrpAlaThrPheIleLysArgPheProHisAsnProArgAspTrp  
 2230 2240 2250 2260 2270 2280  
 GGACAGGCTCCCCTACCTCAACCTCCCATACCTTCCACCAATGCAGGACGCCAGTACCA  
 AspArgLeuProTyrLeuAsnLeuProTyrLeuProProAsnAlaGlyArgGlnTyrHis  
 2290 2300 2310 2320 2330 2340  
 CCTTGCCATGGCTGCATCAGAGTTCAAAGAGACCCCTGAAGTTCGAGAGCGCGTCAGAGC  
 LeuAlaMetAlaAlaSerGluPheLysGluThrProGluLeuGluSerAlaValArgAla  
 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
 CATGGAAGCAGCAGCCAACGTGGACCCACTATTCCAATCTGCACTCAATGTGTTCATGTG  
 MetGluAlaAlaAlaAsnValAspProLeuPheGlnSerAlaLeuAsnValPheMetTrp  
 2410 2420 2430 2440 2450 2460  
 GCTGGAAGAGAATGGGATTGTGTCTGATATGGCCAACTTCGCACTCAGCGACCCGAACGC  
 LeuGluGluAsnGlyIleValSerAspMetAlaAsnPheAlaLeuSerAspProAsnAla  
 2470 2480 2490 2500 2510 2520  
 CCATCGGATGCGAAATTTCTTGCAAACGCCACCAAGCAGGTAGCAAGTCGCAAAGAGC  
 HisArgMetArgAsnPheLeuAlaAsnAlaProGluAlaGlySerLysSerGlnArgAla  
 2530 2540 2550 2560 2570 2580  
 CAAGTACGGGACAGCAGGCTACGGAGTGGAGGCCGGGGCCCCACTCCAGAGGAAGCTCA  
 LysTyrGlyThrAlaGlyTyrGlyValGluAlaArgGlyProThrProGluGluAlaGln  
 2590 2600 2610 2620 2630 2640  
 GAGGAAAAAGATACACGGATCTCAAAGAAGATGGAGACTATGGGCATCTACTTTGCAAC  
 ArgGluLysAspThrArgIleSerLysLysMetGluThrMetGlyIleTyrPheAlaThr  
 2650 2660 2670 2680 2690 2700  
 ACCGGAATGGGTAGCACTCAATGGGCACCGAGGCCAAGCCCCGGCCAGCTAAAGTACTG  
 ProGluTrpValAlaLeuAsnGlyHisArgGlyProSerProGlyGlnLeuLysTyrTrp  
 2710 2720 2730 2740 2750 2760  
 GCAGAACACACGGGAAATACCGGACCCAAACGAGGACTATCTAGACTACGTGCATGCAGA  
 GlnAsnThrArgGluIleProAspProAsnGluAspTyrLeuAspTyrValHisAlaGlu  
 2770 2780 2790 2800 2810 2820  
 GAAGAGCCGGTTGGCATCAGAAGAACAAATCATAAGGGCAGCCACGTCGATCTACGGGGC  
 LysSerArgLeuAlaSerGluGluGlnIleIleArgAlaAlaThrSerIleTyrGlyAla  
 2830 2840 2850 2860 2870 2880  
 TCCAGGACAGGCAGAGCCACCCAGGCTTTCATAGACGAAGTTGCTAAAGTCTATGAAAT  
 ProGlyGlnAlaGluProProGlnAlaPheTleAspGluValAlaLysValTyrGluIle  
 2890 2900 2910 2920 2930 2940  
 CAACCATGGGCGTGGCCCAACCAAGAACAGATGAAAGATCTGCTCTTGACTGCGATGGA  
 AsnHisGlyArgGlyProAsnGlnGluGlnMetLysAspLeuLeuLeuThrAlaMetGlu  
 2950 2960 2970 2980 2990 3000  
 GATGAAGCATCGCAATCCAGGCTGGCTCCACCAAGCCCAAGCCAAAACCAATGCTCC  
 MetLysHisArgAsnProArgLeuAlaProProLysProLysProLysProAsnAlaPro  
 3010 3020 3030 3040 3050 3060  
 AACACAGAGACCCCTGGTCGGCTGGGCCGCTGGATCAGGACTGTCTCTGATGAGGACCT  
 ThrGlnArgProProGlyArgLeuGlyArgTrpIleArgThrValSerAspGluAspLeu  
 3070 3080  
 TGAGTGAGGCTCCTGGGAGTCTCCCGA  
 Glu\*\*\*

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は本発明の実施例におけるIBDVの第一分節cDNAのクローニングと組み換えベクターの構築手順を示したものである。すなわち、cDNAのクローニングには8種類のプライマー（図中三角矢印）を用い、A、B、CとDの4つの部分にわけて、第一分節RNA（LS-RNA）をcDNA化し、それぞれのcDNA断片はpGEMベクターにクローニングし、図中に表記してある制限酵素によるDNAの切断とT4DNAライゲースによるDNAの結合（ligation）を繰り返して、4つの断片を1つの断片（VP0）に再構築した事を示したものである。

【図2】図2は得られたIBDVのcDNA断片を組み換えバキュロウイルス作製用トランスファーベクターに再構築する手順を示したものである。すなわち、図中に表記している制限酵素でcDNAを切り出した後、末端をクレノー酵素（Klenow Enzyme）で平滑化（Fill-in）し、トランスファーベクターに断片を挿入したことを示している。

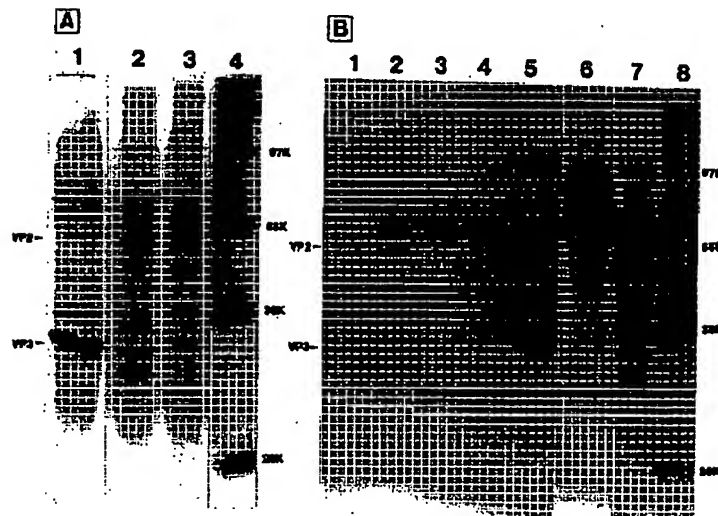
【図3】図3は組換えバキュロウイルス感染細胞において産成される蛋白質を示したものであり、Aはクマシーブリリアントブルーで染色したSDS-12.5%ゲル電気泳動像を示している。図中レーン1は野生型バキュロウイルス感染細胞、レーン2は組換えバキュロウイルス感染細胞、レーン3は非感染細胞、レーン4は分子量マーカーを泳動したものである。Bは同様の電気泳動

後、フィルターにウエスタンブロッティングしたものであり、図中レーン1から5まではIBDV感染鶏血清と反応させたもので、レーン6から8までは抗体と反応させずにアミドブラックでフィルターを染色したものである。図中レーン2と6は組換えバキュロウイルス感染細胞の培養上清、レーン3は非感染細胞の培養上清、レーン4は非感染細胞、レーン5と7は組換えバキュロウイルス感染細胞、レーン8は分子量マーカーを泳動したものである。

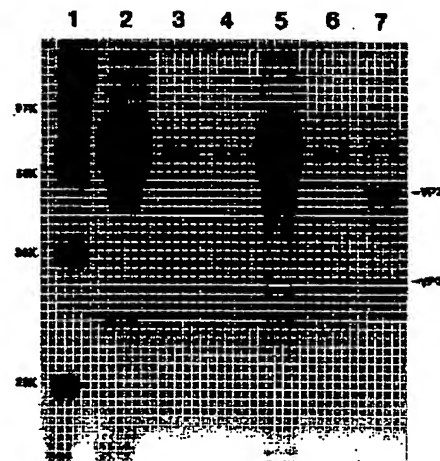
10 【図4】図4は組換えバキュロウイルス感染細胞の培養上清に産成される組換え蛋白質について遠心分離の結果を示したものであり、図中レーン2から4は野生型バキュロウイルス感染細胞の培養上清、レーン5から7は組換えバキュロウイルス感染細胞の培養上清を遠心分離後、SDS-12.5%ゲル電気泳動したものである。レーン1は分子量マーカー、レーン2と5は遠心の最上層分画、レーン3と6は15%シュクロース分画、レーン4と7は60%シュクロース分画をそれぞれ電気泳動したものである。

20 【図5】図5は組換えバキュロウイルス感染細胞培養上清に現れる粒子構造物をネガティブ染色後、電子顕微鏡で観察した結果を示している。図中AからCまでは組換えバキュロウイルス由来、DとEは野生型バキュロウイルス由来であり、図中の太線は500μmのスケールを表している。

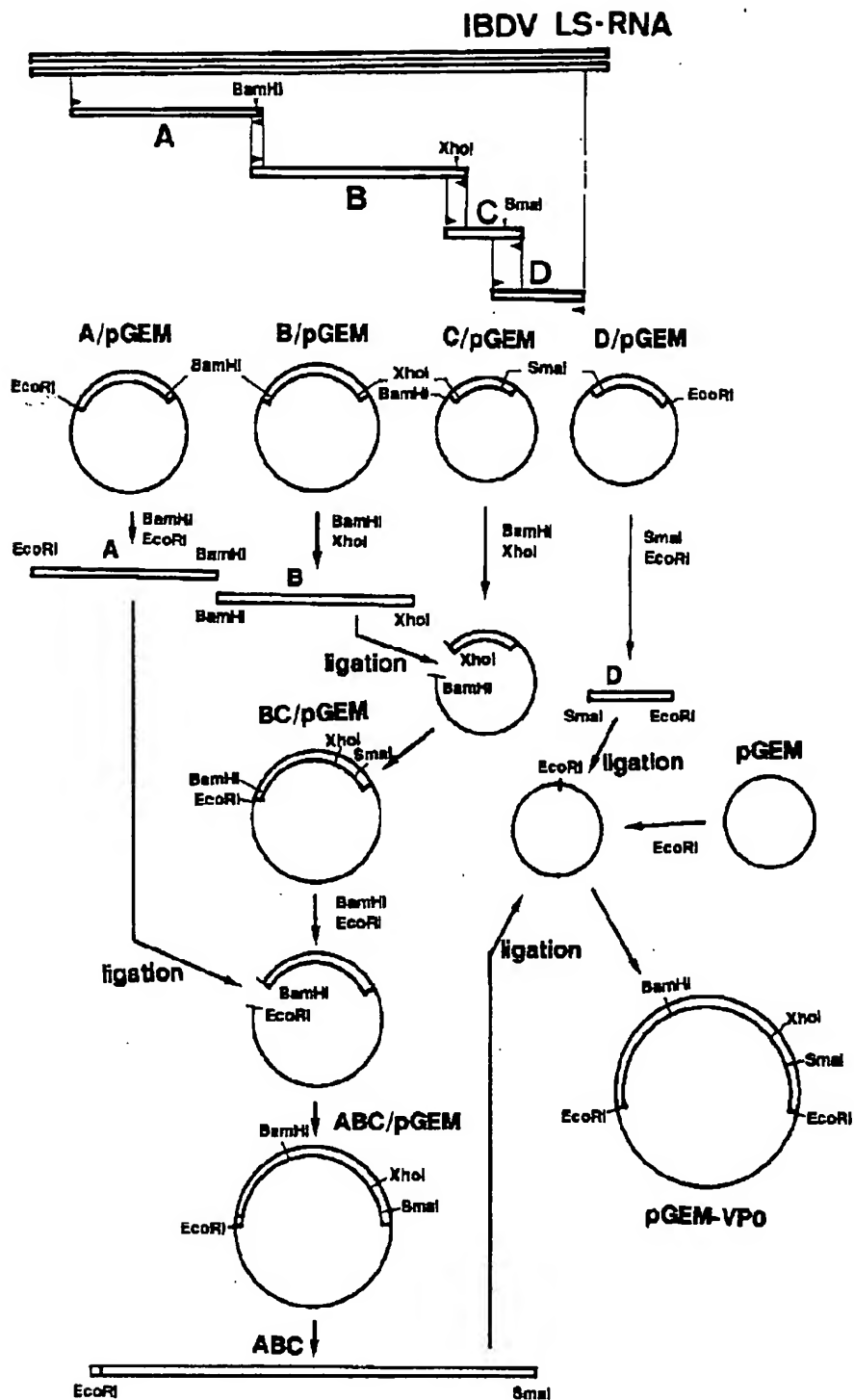
【図3】



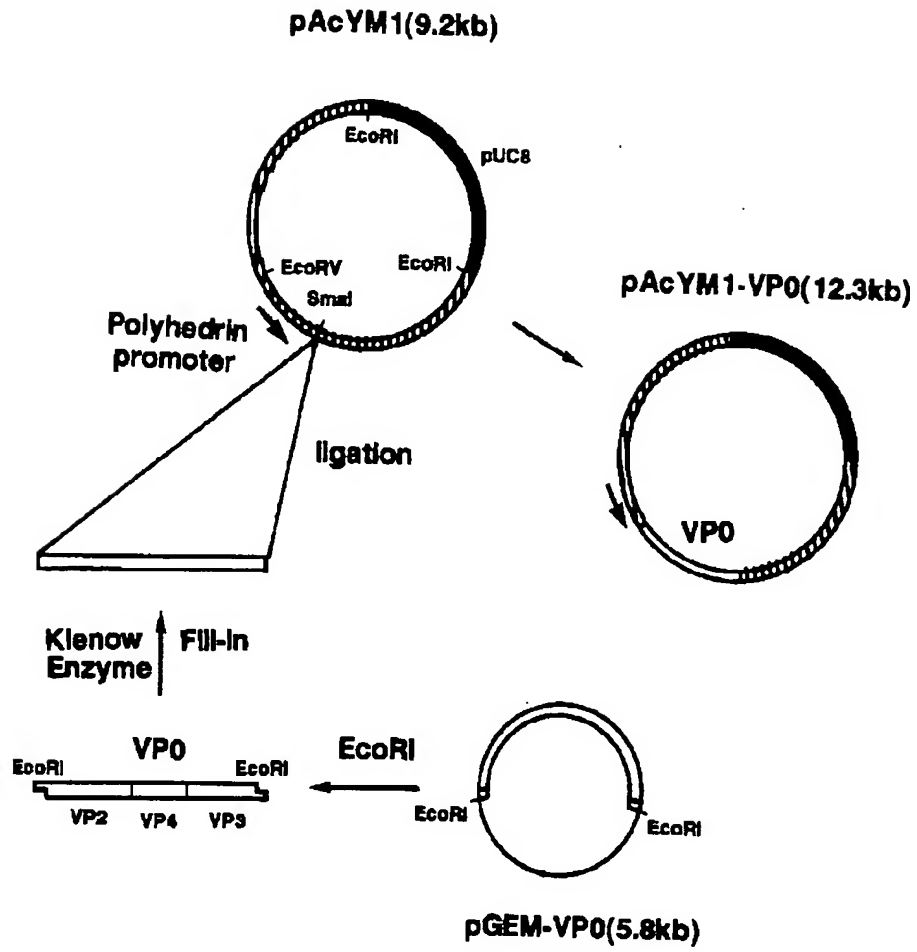
【図4】



【図1】

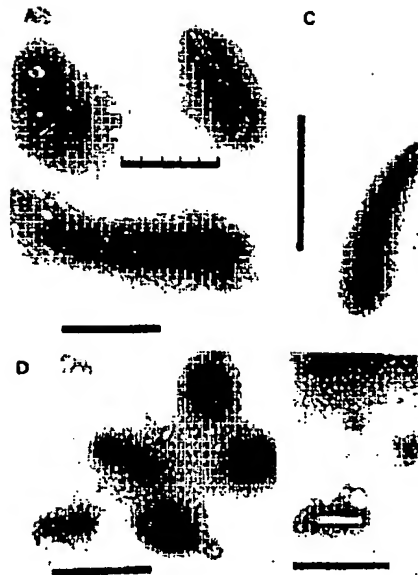


【図2】





【図5】




---

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

G 0 1 N 33/569

// C 1 2 N 15/41

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

L 9015-2 J

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**